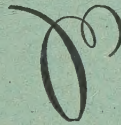


Montpellier 1969

Bernard DESCOMPS et André CRASTES DE PAULET

Étude du site actif de la 17- β -hydroxystéroïde :
NAD(P) oxydoréductase soluble du placenta humain



IMPRIMERIE MAURICE DECLUME
LONS-LE-SAUNIER

—
1969
—



ÉTUDE DU SITE ACTIF DE LA 17- β -HYDROXYSTÉROÏDE : NAD(P) OXYDORÉDUCTASE SOLUBLE DU PLACENTA HUMAIN (*),

par Bernard DESCOMPS (**) et André CRASTES DE PAULET.

*Groupe de Recherches sur la Biochimie des Stéroïdes (INSERM U. 58),
Institut de Biologie, Faculté de Médecine, 34 - Montpellier.*

(Mémoire reçu août 1969).

Résumé. — Ce travail a pour objet de définir la géométrie du site enzymatique de cette déshydrogénase en utilisant les concepts théoriques développés par PRELOG, déjà analysés et justifiés dans l'étude de la 3(ou 17)- β -hydroxystéroïde oxydoréductase de *Pseudomonas testosteroni*. Dans ce but, les substrats essayés ont été choisis de manière à préciser les « domaines interdits » dans le plan du noyau (5 α) gonane et de part et d'autre de ce plan (faces α et β).

Cet étude est réalisée sur près de cinquante 17- β -hydroxystéroïdes ainsi que quelques substrats bi, tri ou pentacycliques hydroxylés présentant au niveau de la fonction oxydable une jonction trans hydrindane analogue à celle du 17- β -œstradiol. Il s'en dégage les éléments remarquables suivants distinguant nettement cet enzyme de l'enzyme bactérien :

1°) Les 17- β -hydroxy-œstrane stéroïdes non aromatiques sont oxydables à des vitesses très supérieures à leurs homologues 19-méthyl (17- β -hydroxy androstane stéroïdes).

2°) Les 3 oxo, 17- β -hydroxystéroïdes ne donnent pas d'inhibition par excès de substrat.

3°) Le site enzymatique admet des substrats substitués en C3 par des groupements encombrants : benzyl, phtalyl, caproyl.

4°) L'accumulation d'électrons délocalisés au niveau du cycle B semble favoriser l'adaptation du substrat au site enzymatique.

L'empreinte du site enzymatique déduite de cette étude peut être comparée à une dépression ou une fente irrégulière à concavité supérieure présentant une zone large (6 à 7 Å) recevant les cycles C et D et une zone étroite (3,5 à 4,5 Å) correspondant aux cycles A et B, et librement ouverte du côté opposé au site de réduction, l'accès du stéroïde au site enzymatique se faisant dans le plan de la molécule par le bord C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₁₄, C₁₅, C₁₆.

La 17- β -hydroxystéroïde : NAD (P) oxydoréductase (17 H.S.O.R.) du placenta humain transfère réversiblement l'hydrogène de la face « B » de la molécule d'amide nicotinique : il s'agit d'un « B enzyme » selon la

(*) Travail réalisé avec la collaboration technique de J. C. NICOLAS, ingénieur technicien INSERM.

(**) Chargé de Recherches à l'INSERM.

nomenclature proposée par LEVY, TALALAY et VENNESLAND [1]. Cette stéréospécificité démontrée par les travaux de JARABAK [2] et WARREN [3] est identique à celle d'une autre oxydoréductase pyridinique NAD dépendante, la 3(ou 17)- β -hydroxystéroïde : NAD oxydoréductase de *P. testosteronei* [TALALAY, 4]. Pour l'un et l'autre enzyme le substrat stéroïde est donc présenté toujours à la même face « B » de l'amide nicotinique. Il est donc possible :

1°) de préciser la géométrie du site de fixation de l'enzyme placentaire en analysant le comportement cinétique de cet enzyme à l'égard de différents substrats et analogues structuraux selon la méthode justifiée par FOSSET et CRASTES DE PAULET [5].

2°) de comparer les caractéristiques de ce site avec celles du site de fixation de la 3(ou 17)- β -hydroxystéroïde NAD oxydoréductase de *P. testosteronei* (« β » enzyme) décrites dans un travail antérieur [FOSSET et CRASTES DE PAULET, 6].

L'objet de ce mémoire est de rapporter les études cinétiques portant sur près de 50 stéroïdes et analogues structuraux et de comparer la géométrie du site de fixation déduite de ces études cinétiques à celle du site du β enzyme de *P. testosteronei*. Ces substrats ont été choisis de façon à préciser l'importance des facteurs dimensionnels (encombrement stérique) et électroniques au niveau des noyaux A et B dans l'adaptation substrat-site de fixation ; pour tous ces substrats l'environnement de la fonction alcool secondaire oxydée est analogue à celui du 17- β -œstradiol « substrat physiologique » de cet enzyme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1°) Purification de l'enzyme.

L'enzyme a été purifié par précipitation par le sulfate d'ammonium, chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (DEAE Sephadex) et filtration sur tamis moléculaire (Sephadex G150). Les modalités techniques et les résultats obtenus ont fait l'objet d'un précédent mémoire [7].

2°) Mesures cinétiques.

Les mesures cinétiques ont été effectuées à 37°C avec un spectrophotomètre Zeiss PMQII dans des cuves de 5 cm de chemin optique et dans des conditions décrites par FOSSET et CRASTES DE PAULET [5] pour l'enzyme de *P. testosteronei* ; tous les points sont la moyenne d'au moins 4 déterminations.

Différents systèmes tampons ont été utilisés en vue de déterminer l'effet du pH sur ces activités : ces 4 tampons ont été préparés selon GOMORI [8].

tampon 1 : $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}, \text{PO}_4\text{HK}_2$	de pH 6,4 à pH 8,1
tampon 2 : Tris, HCl	de pH 7,8 à pH 9,2
tampon 3 : $\text{CO}_3\text{HNa}, \text{CO}_3\text{Na}_2$	de pH 9 à pH 11
tampon 4 : $\text{PO}_4\text{HK}_2, \text{P}_2\text{O}_7\text{Na}_4$	de pH 6,4 à pH 11.

La variation de pH au cours des mesures n'a jamais dépassé $\pm 0,1$ unité pH.

3°) Expression des résultats.

Les vitesses initiales d'oxydation (v) sont exprimées en valeur relative par rapport à la vitesse maximum d'oxydation de l'œstradiol prise conventionnellement égale à 100. Ce mode d'expression arbitraire utilisé par ENGEL [9] permet une comparaison facile des résultats obtenus avec ceux de la littérature. Ces vitesses initiales (v) sont portées sur un graphique en fonction du rapport $v/[S]$ dans lequel $[S]$ est la concentration en substrat (représentation d'EADIE [10]). La pente de la droite obtenue donne la constante de Michaelis K_m et l'extrapolation de la droite $v = f v/[S]$ pour $S = 0$ détermine la vitesse maximum initiale V .

RÉSULTATS.

Détermination des conditions optimales de mesure (pH, température) :

a) *Action du pH* : l'activité de la 17- β -H.S.O.R. a été mesurée dans un domaine de pH compris entre 6,4 et 11, réalisé au moyen des 4 systèmes tampons précédemment décrits ; les intervalles de mesure étaient de 0,2-0,3 unités pH. La figure 1 reproduit les résultats obtenus avec ces

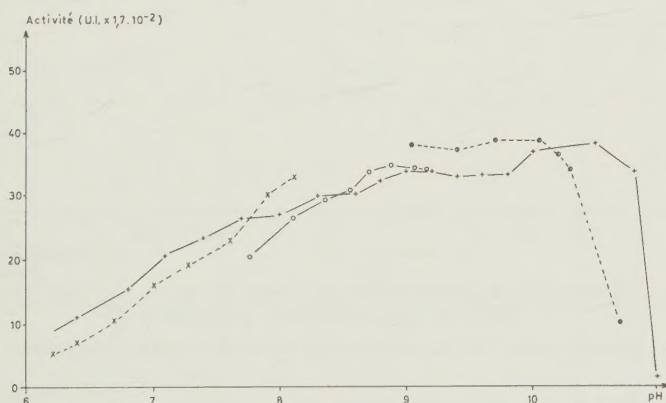


FIG. 1. — Influence du pH sur l'activité de la 17- β -hydroxystéroïde : NAD (P) oxydoréductase placentaire.

- × — — × : tampon 1 : $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, PO_4HK_2 .
- — — ● : tampon 2 : Tris, HCl.
- — — ○ : tampon 3 : CO_3HNa , CO_3Na_2 .
- + — — + : tampon 4 : PO_4HK_2 , $\text{P}_2\text{O}_7\text{Na}_4$.

divers systèmes tampons ; ces résultats seront analysés dans la discussion. Nous retiendrons dès à présent qu'ils justifient dans la suite des mesures l'utilisation du pH 9,5 (pH optimum) réalisé par le tampon n° 4.

b) *Action de la température* : la figure 2 montre que cet enzyme a un Q_{10} très sensiblement égal à 2 avec une température optimale de 42°C . Néanmoins on observe au-delà de 40°C une inactivation lente de l'enzyme au cours de la mesure (se traduisant par une diminution progressive de la vitesse d'oxydation) alors même que les mesures sont réalisées pour des concentrations saturantes en substrat. Cette constatation nous a conduit à réaliser à 37° toutes les autres mesures cinétiques analysées ci-dessous.

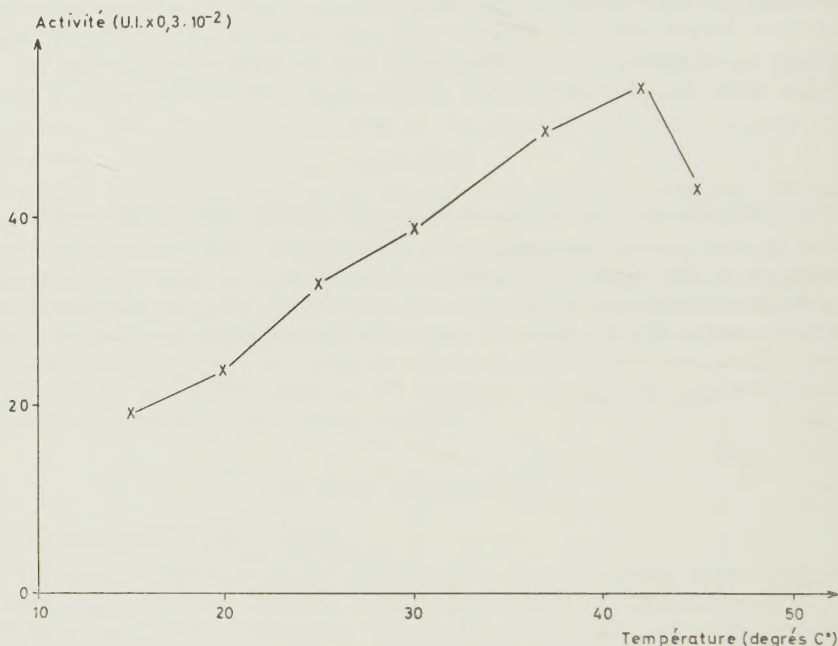


FIG. 2. — Influence de la température sur l'activité de la 17- β -hydroxystéroïde : NAD (I) oxydoréductase placentaire (chaque point est la moyenne d'au moins quatre mesures).

Etude cinétique des différents substrats.

L'action de l'enzyme sur les différents substrats est généralement exprimée par leur constante de Michaelis K_m et leur vitesse maximale d'oxydation V déterminées dans le système de représentation d'EADIE. Toutefois, pour les substrats ayant des vitesses d'oxydation très faibles (ce qui entraîne une imprécision trop grande sur V et K_m) dans les colonnes « V » des tableaux I à V sont portées les vitesses initiales d'oxydation de ces différents substrats mesurées à la concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ M et toujours exprimées relativement à la vitesse d'oxydation de l'œstradiol mesurée à la même concentration.

A. — Influence du degré de saturation des cycles A ou B.

La figure 3 représente les courbes de cinétique d'oxydation d'une série de substrats non oxygénés sur le cycle A, ne différant que par le nombre et la position des doubles liaisons affectant les cycles A ou B et par la nature de la substitution en C₁₀ (leur formule est représentée dans les

TABLEAU Ia et Ib.

*Influence du degré de saturation des cycles A ou B
et de la substitution en C₁₀ sur V et Km d'oxydation
de 17- β -hydroxystéroïdes.*

TABLEAU Ia

TABLEAU Ib

N°	Substrat	V	Km.10 ⁵	N°	Substrat	V	Km.10 ⁵
4		68	2,4	1		0	
5		80	1,9	2		≈ 0	
6		106	0,9	3		8	1,4
7		160	1,4				
8		195	1,1				

tableaux Ia et Ib). Ces cinétiques sont parfaitement Michaeliennes ; les vitesses maximales V et les constantes de Michaelis Km caractéristiques des différents substrats sont données dans les tableaux Ia et Ib.

L'analyse comparée des cinétiques d'oxydation des substrats 4, 5, 6, 7 et 8 montre que l'introduction progressive de une, deux ou trois doubles liaisons ou de leur équivalent (type structure 3-5 cyclo) sur le noyau A augmente V en même temps que Km diminue. L'effet maximum est obtenu

pour la structure aromatique 8 qui possède une vitesse maximale supérieure à celle de l'œstradiol 17- β , mais dont l'affinité bien que plus grande que celle du composé 4 est inférieure à celle de l'œstradiol ($K_m = 0,2 \cdot 10^{-6}$ M, cf Tableau V). Un effet comparable est observé pour la série 1,

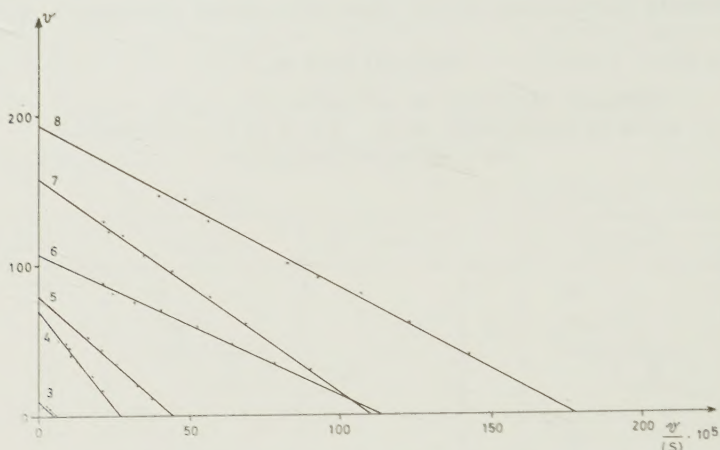


FIG. 3. — Représentation selon Eadie des cinétiques d'oxydation par la 17- β -hydroxystéroïde : NAD (P) oxydoréductase placentaire de 17- β -hydroxystéroïdes différant par le degré de saturation des cycles A et B et par la substitution en C_{10} .

2 et 3 mais il est clair que l'introduction d'un méthyl angulaire C_{19} réduit de façon très importante les vitesses d'oxydation, ce phénomène est étudié plus en détail ci-dessous.

B. — Influence de la substitution en C_{10} .

Dans le Tableau IIa sont rassemblées les structures, les V d'oxydation et les K_m de 4 paires de stéroïdes 19 méthyl et de leurs homologues 19 nor. (*).

La comparaison de ces 4 couples de stéroïdes montre que dans tous les cas la substitution d'un hydrogène par CH_3 en C_{10} amène $V \simeq 0$ même lorsque le noyau A est substitué en 3 par un atome de fluor dont l'effet d'accélération avait été systématiquement observé pour le β enzyme de P. Testosteroni [6].

C. — Effet d'une substitution 5 β methyl.

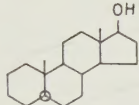
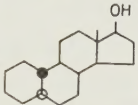
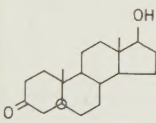
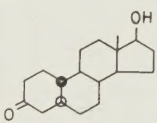
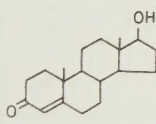
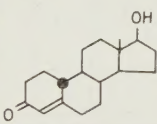
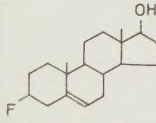
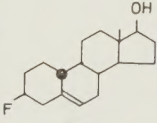
L'introduction d'un groupement méthyl en 5 β a un effet tout aussi défavorable sur les V d'oxydation, comme le montrent les résultats groupés dans le Tableau IIb. Ce tableau rassemble une série de stéroïdes de type

(*) Les cinétiques d'oxydation des composés 12 et 14, parfaitement « Michaeliennes » n'ont pas été reproduites puisqu'elles ne présentent aucune particularité.

Westphalen ; leur vitesse d'oxydation par comparaison au composé non méthylé le plus proche (stéroïde 6, $V = 106$) est extrêmement faible ; on place de groupements acétoxy en position 3 β et 6 β augmente progressivement V .

TABLEAU IIa.

Influence de la nature de la substitution en C_{10} sur V et K_m d'oxydation de 17- β -hydroxystéroïdes.

N°	Substrat	V	$K_m \cdot 10^5$	N°	Substrat	V	$K_m \cdot 10^5$
1		0		4		68	2,4
9		2		12		52	2,3
10		0,5		13		2,5	
11		2,5		14		45	2,5

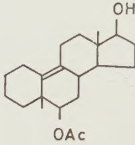
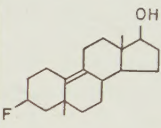
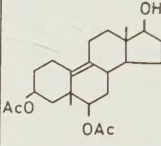
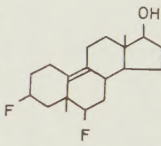
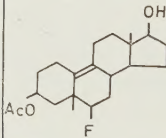
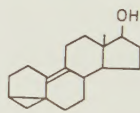
D. — Influence d'une fonction carbonylée en C_3 .

Nous avons, pour étudier cette influence, comparée les cinétiques d'oxydation de deux séries de substrats différant essentiellement par la présence dans une série d'une fonction carbonylée en C_3 : leurs structures avec les V et K_m correspondantes sont données dans le Tableau III et les courbes $v = f(V/[S])$ dans la figure 4.

Toutes ces cinétiques sont Michaeliennes quelle que soit la concentration en substrat : on observe, de façon systématique, que l'introduction d'une fonction carbonylée diminue considérablement la vitesse d'oxydation. On comparera en particulier 4 et 12, 5 et 25 avec 20 et 7 avec 21. Un effet analogue est observé avec les A-nor stéroïdes (comparer 26 avec 22 et 23) ainsi que les stéroïdes méthoxyphénoliques (comparer 28 et 13) et leurs homologues A-des stéroïdes (comparer 27 et 24).

TABLEAU IIb.

Influence d'une substitution 5-β-méthyle sur V et Km de 17-β-hydroxystéroïdes.

N°	Substrat	V	Km. 10 ⁵	N°	Substrat	V	Km. 10 ⁵
15		0		18		8,5	
16		≈ 2		19		11,5	
17		≈ 3		6		106	0,9

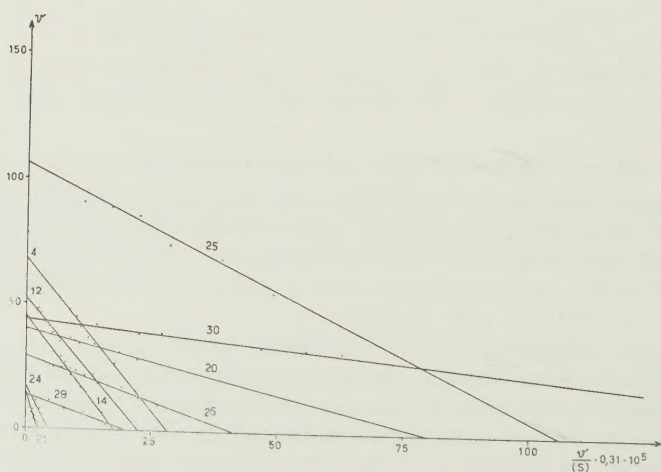
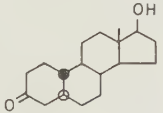
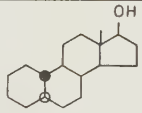
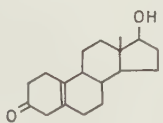
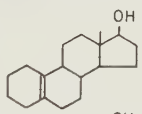
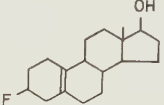
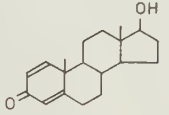
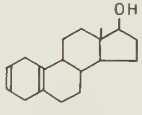
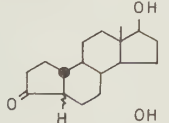
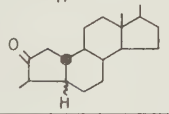
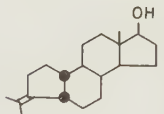
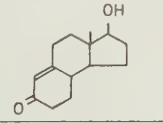
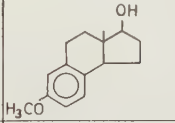
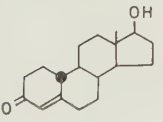
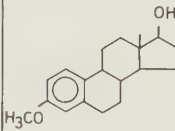


FIG. 4. — Représentation selon EADIE des cinétiques d'oxydation par la 17-β-hydroxystéroïde : NAD (P) oxydoréductase placentaire de 17-β-hydroxystéroïdes représentés Tableaux III et IV.

Une série homogène de 3-oxo, 19 nor stéroïdes dont les cinétiques d'oxydation sont également « Michaeliennes » (Cf. Figure 4 et Tableau IV) montre une particularité remarquable : alors que l'introduction d'une

TABLEAU III.

Influence d'une fonction carbonylée non conjuguée en position 3 sur V et Km de 17- β -hydroxystéroïdes.

N°	Substrat	V	Km.10 ⁵	N°	Substrat	V	Km.10 ⁵
12		52	23	4		68	2,4
20		40	0,5	5		80	1,9
				25		106	1
21		14	6	7		160	1,4
22		≈ 2					
23		≈ 5		26		29	0,7
24		17	3,5	27		860	1,4
13		2,5		28		175	

double liaison non conjuguée est sans effet sur V mais augmente l'affinité (comparer 12 et 20), par contre une double liaison conjuguée diminue V (comparer 12 et 13) et l'extension de la conjugaison à 2 doubles liaisons

TABLEAU IV.

Influence de l'extension sur les cycles B et C de la conjugaison d'une fonction 3-oxo, sur V et Km d'oxydation de 3-oxo 17-β-hydroxy 19-nor stéroïdes.

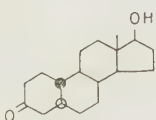
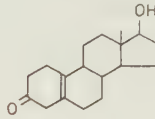
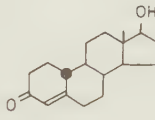
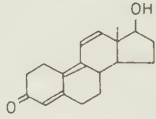
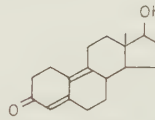
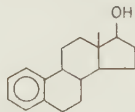
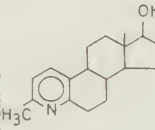
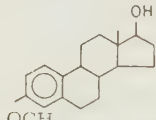
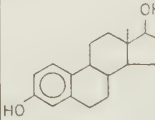
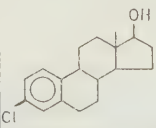
N°	Substrat	V	Km.10 ⁵	N°	Substrat	V	Km.10 ⁵
12		52	2,3	20		40	0,5
				13		2,5	
30		43	0,6	29		14	0,7

TABLEAU V.

Influence de substitutions en position 3 sur V et Km d'oxydation de 17-β-hydroxystéroïdes à noyau A aromatique.

N°	Substrat	V	Km. 10 ⁵	N°	Substrat	V	Km 10 ⁵
8		195	1,1	33		16	0,7
31		175		34		100	0,2
32		227	1,1				

(stéroïde 29) puis 3 doubles liaisons (stéroïde 30) diminue Km et augmente progressivement V qui atteint, pour 30 une valeur supérieure à 40 p. 100 de celle de l'œstradiol.

E. — *Influence d'une substitution en C₃ sur des substrats à type benzénique ou pyridinique.*

Il nous a paru intéressant d'examiner la « place » qu'occupe l'œstradiol 17 β , substrat physiologique de la 17 H.S.O.R. dans un groupe de stéroïdes à cycle A aromatique dont la structure diffère par la polarisation + ou — des différents sommets. La comparaison de V et Km (Cf. Tableau V) des stéroïdes 8, 31 et 32 et d'un analogue pyridinique 33 avec l'œstradiol 34 montre l'importance considérable des effets inductifs sur V et à un degré moindre sur Km (ces stéroïdes sont tous oxydés selon des cinétiques Michaéliennes). Ces effets seront analysés et expliqués dans la discussion.

F. — *Influence de l'encombrement en C₃ et en C₁₁ sur l'œstradiol.*

1°) *encombrement en C₁₁* : l'introduction de substitutions de faible encombrement (-OH, -OCH₃, -OC₂H₅) diminue fortement V et augmente Km (Cf. Tableau VIa).

2°) *encombrement en C₃* : contrairement à ce qui est observé en position C₁₁ l'introduction en C₃ de substituants même très *volumineux* est sans effet majeur sur V ; ainsi le 3 caproyl, 3 benzoyl, 3 hémi phtalyl œstradiol (Cf. Tableau VIb, stéroïds 38 à 43) ont des V qui ne sont diminuées que de 20 à 25 p. 100 par rapport à l'œstradiol ; de plus, les Km de ces différents substrats restent du même ordre de grandeur que celui de l'œstradiol.

G. — *Influence de la nature du noyau polycyclique du substrat.*

Le Tableau VII donne les V et Km d'une série de substrats 17- β -hydroxylés possédant de 2 à 5 cycles : on observe que le substrat bicyclique 44 a une V égale à zéro. De même les substrats pentacycliques 45 et 46 ont une vitesse maximale égale ou voisine de zéro. Par contre, les substrats tricycliques (A-des stéroïdes) sont oxydés à une vitesse mesurable (composé 24) et deviennent même d'excellents substrats lorsque le cycle B possède une structure aromatique (composé 27).

Un composé tel que 47 dont la substitution isopropyl en C₃ recouvre une partie de la zone d'encombrement du noyau aromatique du stéroïde 46, a comme ce dernier une V = 0. On ne peut cependant déduire de ces 2 résultats l'importance propre d'une substitution en C₃ ou C₅ car 46 et 47 sont des stéroïdes 19 *méthyl* que l'on peut considérer comme dérivant de la testostérone dont on sait que V est *très faible mais non nulle* contrairement à ces deux stéroïdes. Enfin, une jonction B-C cis ne supprime pas l'effet défavorable du méthyl C₁₉ et de la cétone conjuguée 3-oxo delta-4 : la rétrotestostérone (stéroïde 48) est encore un plus mauvais substrat que la testostérone.

TABLEAUX VIa et VIb.

Influence de l'encombrement stérique en position 3 et 11 sur V et Km d'oxydation de dérivés du 17-β-œstradiol.

TABLEAU VI a

N°	Substrat	V	Km.10 ⁵	N°	Substrat	V	Km.10 ⁵
35		7	0,4	34		100	0,2
36		20		37		47	0,5

TABLEAU VI b

N°	Substrat	V	Km.10 ⁵	N°	Substrat	V	Km.10 ⁵
38		97	0,1	41		70	0,2
39		93	0,1	42		75	0,2
40		89	0,1	43		75	0,5

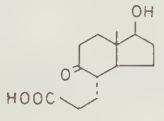
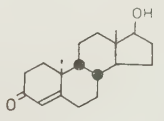
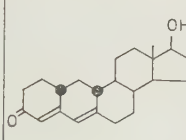
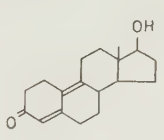
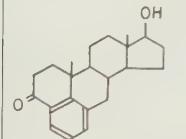
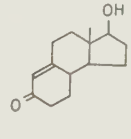
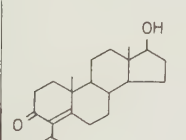
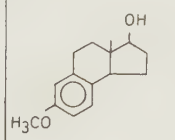
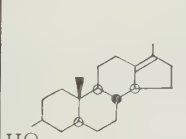
DISCUSSION.

Etude de l'activité en fonction du pH.

Les seules données de la littérature que nous ayons pu relever sont celles de ENGEL [11] : cet auteur observe une courbe d'activité en fonction du pH analogue aux nôtres : néanmoins nous n'observons pas une aug-

mentation aussi nette de l'activité pour les domaines de pH de 9,5 à 10,5. Nos résultats et ceux de ENGEL montrent que la pente maximale de cette courbe se situe entre pH 6,5 et 7,5.

L'étude de la courbe $\log V = f(\text{pH})$ montre, de fait, un seul point anguleux net pour un pH de 6,8-7,2 selon la nature du tampon utilisé ; étant donné que l'ionisation du substrat (3-méthoxy, 17- β -hydroxy A des -œstra-

N°	Substrat	V	Km 10 ⁵	N°	Substrat	V	Km. 10 ⁵
44		0		48		0	
45		3		29		14	0,7
46		0		24		17	3,5
47		0		27		860	1,4
49		0		TABLEAU VII. <i>Influence de la nature du noyau polycyclique sur V et Km d'oxydation de 17-β-hydroxystéroïdes.</i>			

5, 7, 9, triène) ne peut être responsable des phénomènes observés, ce résultat est compatible avec la participation d'un ou plusieurs résidus d'histidine dans la constitution du site actif [12].

Analyse des cinétiques d'oxydation des différents substrats étudiés.

L'étude systématique que nous avons réalisée permet de dégager un certain nombre d'éléments nouveaux :

I — Cet enzyme est parfaitement apte à l'oxydation de 17- β -hydroxystéroïdes *non aromatiques* ; les éléments structuraux (facteurs stériques ou électroniques) des noyaux A et B jouant un rôle déterminant sur V et Km sont par ordre d'importance décroissante :

1. — Facteurs stériques.

Un méthyl axial en C 10 β , C 10 α ou C 5 β : effet défavorable maximum (cf les séries de stéroïdes des tableaux II a et II b ainsi que le stéroïde 48 du tableau VII).

2. — Facteurs électroniques.

a) Doubles liaisons sur les cycles A et B, en l'absence de fonctions carbonylées : effet favorable, à la fois sur V et Km, croissant avec le nombre de doubles liaisons et maximum pour la structure triénique conjuguée 8 (cf. série des stéroïdes du tableau I a).

b) Fonction carbonylée en C₃ : effet défavorable modéré (comparer les stéroïdes 4 : V = 68, Km = $2,4 \cdot 10^{-5}$ et 12 : V = 52, Km = $2,3 \cdot 10^{-5}$), modifiable par l'introduction de doubles liaisons conjuguées et variant selon l'extension de la conjugaison : une double liaison conjuguée diminue V (stéroïde 13, V = 2,5) l'extension de la conjugaison vers les cycles B et C augmente V et diminue Km (stéroïde 29 : V = 14, Km = $0,7 \cdot 10^{-5}$ et stéroïde 30 : V = 43, Km = $0,6 \cdot 10^{-5}$).

c) Substitution sur les cycles A ou B par un ou deux atomes de fluor : effet favorable modéré (comparer 5 et 25 tableau III, et cf. tableau II b).

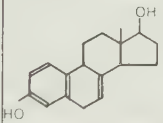
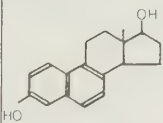
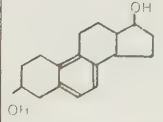
Ces résultats appellent les commentaires suivants :

1°) Les 17- β -hydroxy-19-nor stéroïdes sont oxydables par l'enzyme placentaire à une vitesse comparable à celle de l'œstradiol : ainsi le 17- β -hydroxy-19-nor-androstanol (stéroïde 4) a une vitesse V = 68 et la « triénolone » 30 une vitesse V = 43 ; cependant l'affinité de ces stéroïdes pour l'enzyme est en moyenne 3 à 10 fois plus faible que celle de l'œstradiol. Ce fait à notre connaissance n'avait pas été signalé : les seules indications données dans la littérature concernent des stéroïdes à cycles A ou B *aromatiques* [ENGEL, 9] ou des C 19 stéroïdes (testostérone ; 3, 17-dioxo-androsta-4-ène) [TALALAY, 13] ou des C 21 stéroïdes (progestérone ; 3 oxo, 20 α -hydroxy-prégna-4-ène [PURDY, 14] stéroïdes qui étaient apparus comme de *très mauvais* substrats. Nos résultats expliquent ce phénomène : l'encombrement de la face β par un groupement méthyle *axial* au niveau des cycles A et B (substitution en C₁₀ : C 19 stéroïdes, ou en C₅ : stérols de type Westphalen) empêche la formation du complexe enzyme-substrat. Cet effet stérique défavorable d'une substitution méthyle en C₁₀ ou C₅ constitue un premier caractère distinctif majeur de cet enzyme par rapport à l'enzyme de *Pseudomonas testosteroni* [FOSSER, 5] pour lequel les C 19 stéroïdes sont d'excellents substrats.

2°) Un groupement fonctionnel 3-oxo diminue V : cet effet est encore plus net lorsque le groupement oxo est conjugué : comparer la série 4, 12 et 13 (tableau III) ; cet effet défavorable oppose encore le comportement

de cet enzyme à celui de l'enzyme de *Pseudomonas testosteroni* pour lequel, dans les mêmes conditions est systématiquement observé un effet d'accélération. De plus l'introduction d'une fonction carbonylée en C₃ conserve à la cinétique d'oxydation son caractère Michaelien, contrairement à ce qui est constamment observé avec l'enzyme de *P. testosteroni* (apparition du phénomène d'inhibition par excès de substrat) : en particulier la « triénolone » 30, bon substrat pour l'enzyme placentaire donne une cinétique parfaitement Michaelienne avec cet enzyme, alors qu'une très importante inhibition par excès de substrat était observée avec l'enzyme bactérien.

TABLEAU VIII

N°	Substrat	V	Reference
a		121*	(13)
b		116*	(13)
c		63%	(9)

* Valeurs calculées (rapportées à V = 100 du 17- β -œstradiol)

De plus, la comparaison des effets sur V et Km de l'introduction de carbones trigonaux (C éthyléniques ou équivalent : 3-5-cyclo-stéroïdes, carbonyles) suggère l'importance de l'accumulation d'électrons π sur le cycle B (ou accessoirement sur le cycle C), *beaucoup plus que sur le cycle A* dans l'adaptation du substrat sur le site enzymatique. C'est ainsi que 3 est meilleur substrat que 2 (Tableau I b), 6 meilleur substrat que 5 (Tableau I a) et que les V d'oxydation des stéroïdes 3-oxo conjugués se classent dans l'ordre 30 > 29 > 13 (Tableau IV) ; de même les A- des stéroïdes sont de bien meilleurs substrats que leurs homologues « normaux » ; (comparer dans le Tableau III, 24 avec 13 et 27 avec 28 ; ce dernier résultat est à rapprocher des observations de ENGEL [9] et de TALALAY [13] : les stéroïdes a, b, c, ont des vitesses d'oxydation supérieures à celle de l'œstradiol (Cf. Tableau VIII).

On observera en particulier la valeur très élevée de V pour le stéroïde C, comparable à celle du A- des stéroïde 27 (Tableau III) ; les valeurs de V pour les stéroïdes a et b sont vraisemblablement supérieures aux valeurs calculées d'après les résultats de TALALAY [13] qui a effectué les mesures à *une seule concentration* en substrat, probablement *non saturante* : pour les stéroïdes 12 et 8 dont les V sont respectivement 52 et 195, les valeurs calculées d'après les résultats de TALALAY sont en effet respectivement de 10 et 72,5. L'ensemble de ces résultats est compatible avec l'idée que le site enzymatique possède une région présentant une affinité particulière pour les électrons π distante de 4 à 6,5 Å du carbone 17 ; dans ces conditions la fixation par cette région d'une structure stéroïde dont les électrons π sont localisés à une distance supérieure, doit placer le groupement 17 β -OH en position moins favorable par rapport au site de réduction : c'est ainsi que $V = 600$ à 800 pour les stéroïdes B aromatique, 100 à 200 pour les stéroïdes A aromatiques et 50 à ≈ 0 pour les stéroïdes 3-oxo et 3-oxo Δ -4. Cette hypothèse peut également suffire à expliquer la valeur très faible de V observée pour la cétone conjuguée à cycle surnuméraire (stéroïde 45, Tableau VII : $V = 3$) ; l'introduction de ce cycle porteur de trois carbones trigonaux éloigne en effet du carbone 17 la région du substrat riche en électrons délocalisés. L'augmentation de la « longueur » du substrat ne doit vraisemblablement pas être prise en considération puisque le site enzymatique admet très facilement des dérivés 3-aryloxy ou alkyloxy de l'œstradiol (cf. Tableau VI b). Dans le même sens se placent les observations de ENGEL [9] selon lesquelles des dérivés de l'œstradiol diversement substitués ($-\text{NH}_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$) en C_1 , C_2 , C_4 sont encore oxydés à des vitesses mesurables à l'exception des dérivés substitués en 2 ou 4 par un atome de fluor ($V = 0$) dont on connaît l'aptitude à donner des liaisons hydrogène stables (formation d'un cycle surnuméraire C_2 (ou C_4), F. H. O. C_3 avec perturbation considérable de la distribution des charges sur les carbones du cycle A).

II. — La superposition des substrats selon l'axe O- C_{17} , selon un procédé inspiré de la théorie de PRELOG, analysé et justifié dans de précédents travaux [FOSSET et CRASTES DE PAULET, 5, 6] conduit à une géométrie du site de fixation présentant les caractères remarquables suivants :

A. La spécificité « absolue » 17- β de cet enzyme reconnue par ENGEL [9] opposable à la « bi-spécificité » 3- β , 17- β du β enzyme de *P. testosteronei* détermine une large région interdite dans l'axe de la liaison oxygène-carbone 17 (figure 5). Ceci pouvait être dû à l'encombrement du noyau stéroïde dans le plan en particulier des cycles C et D ou (et) à l'encombrement stérique du méthyl axial C_{18} qui occupe, lorsque le stéroïde est en position « inverse », une région proche des méthyls C_{19} - β ou C_5 - β en position normale, c'est-à-dire une région interdite dans le plan vertical (figure 6). Nous avons levé cette alternative en montrant que le stéroïde 49 où le méthyl axial C_{18} a été transposé en C_{17} dans le plan du cycle D n'est pas accepté par l'enzyme ($V = 0$).

L'existence de cette région interdite qui rend compte de la spécificité 17- β « absolue » de cet enzyme explique également, par voie de conséquence, une autre propriété remarquable : aucun 17- β -hydroxy-3-oxo stéroïde accepté par le site ne donne de phénomène d'inhibition par excès

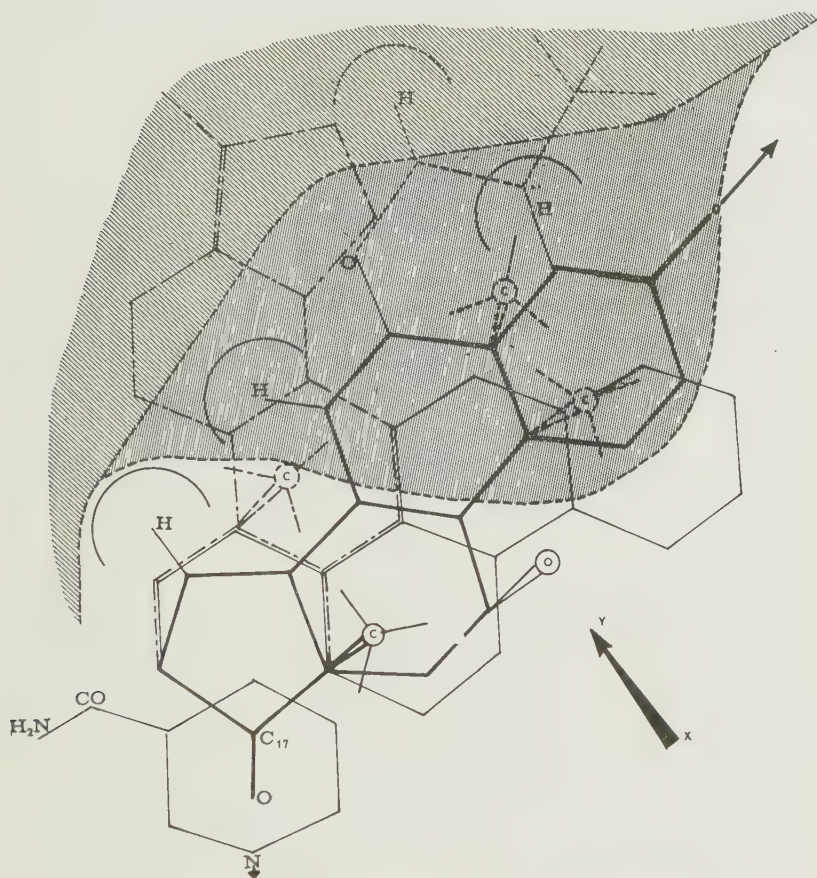


FIG. 5. — Schématisation dans le plan des substrats du site de la 17- β -hydroxystéroïde : NAD (P) oxydoréductase placentaire :

Traits pleins : substrats et substitution admis par le site enzymatique (arcs de cercle = rayon de Van der Waals des hydrogènes acceptables par le site).

Traits pointillés : substrats et substitutions se plaçant dans des régions interdites (arcs de cercle = rayon de Van der Waals des hydrogènes non acceptables par le site).

Hachures claires : région interdite dans le plan moyen de la molécule de substrat.

Hachures sombres : région interdite au-dessus de la face β des cycles A et B des substrats.

— : liaison C-C de l'œstra-1,3,5 (10) triène.

— : liaison C-C du 3-méthoxy 17- β -D-homo œstra 1,3,5 (10) triène.

- - - : liaison C-C du 3- β -hydroxy 17 méthyl 18-nor (5 α)androsta-13 (17)ène.

de substrat, contrairement à ce qui est observé avec le β enzyme de *P. testosteronei* - la différence de comportement pour ces deux enzymes est due à l'impossibilité de présentation du substrat en position inverse dans le cas de l'enzyme placentaire [6].

La situation de cette région interdite rend compte également de l'adaptation des 16- β -hydroxy stéroïdes ainsi que des 17- β -hydroxystéroïdes antipodaux. Les limites de cette région interdite au niveau des cycles A et B sont précisées par les stéroïdes 46 et 47 (Tableau VII) : leur vitesse d'oxydation nulle indique que les carbones surnuméraires du cycle benzénique ou du groupement 4 isopropyl se placent dans la région interdite.

Par contre les substitutions 3-aryloxy ou 3-alkyloxy aussi importantes qu'un groupement benzyl, hémiphtalyl ou caproyl n'empêchent pas l'adaptation du substrat au site de fixation, ce qui suggère le libre accès de ce site dans la région opposée au site d'oxydation. Ce résultat est particulièrement intéressant car il permet de prévoir et d'expliquer la possibilité pour cet enzyme de métaboliser les conjugués en 3 des œstrogènes tel le 3-sulfate comme l'a signalé WARREN [15], de plus une situation analogue pour les protéines spécifiques des organes cibles est peut être responsable de la persistance des effets biologiques des dérivés 3-alkoxy ou 3-alkyloxy de l'œstradiol [16].

De même, le site de fixation doit être largement « ouvert » à droite de l'axe oxygène-carbone 17 puisque le 3-méthoxy, 17- β -hydroxy-D-homo œstra-1,3,5 (10)-triène est accepté par cet enzyme [ENGEL : 9].

B. L'analyse du comportement de stéroïdes dont les faces α ou β sont encombrées par des groupements méthyles axiaux en diverses positions, ou dont le squelette tétracyclique présente une angulation à concavité α (jonction B - C cis ou C - D cis) permet de déterminer les régions interdites dans un plan perpendiculaire à celui des noyaux 5- α gonane. Le schéma que nous proposons (figure 6) rend compte de la non adaptation au site de fixation des stéroïdes ci-après :

- 19-méthyl stéroïdes, effet du méthyl C 19, 10 β axial
- stérols de type Westphalen, effet du méthyl C 19, 5 β axial
- rétrotestostérone, effet du méthyl C 19, 5 α axial
- 14 iso-œstrone : jonction C - D cis (13- β méthyl, 14- β H [ENGEL, 9])
- 9 iso-œstrone : jonction B - C cis (8- β H, 9- β H) [ENGEL, 9]

Il est par contre compatible avec l'accès des stéroïdes substitués en position 11- β axial ($-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OC}_2\text{H}_5$) dont les vitesses d'oxydation sont encore respectivement : 20, 7 et 47.

Les substrats présentant une face α non encombrée et convexe seront facilement adaptés comme l'avait indiqué ENGEL [9] pour la série des isomères 8, 9, 14 de l'œstrone ; le « pincement » dans le sens vertical du site de fixation dans la région des cycles A et B permet l'adaptation facile des substrats 19-nor et surtout de molécules à structure plane dans la région des cycles A et B planéité réalisée par une structure aromatique ou une succession de carbones trigonaux à substitutions équatoriales.

En résumé l'existence de contraintes stériques non seulement sur la face α mais sur la face β du substrat paraît incompatible avec l'accès au site par l'une ou l'autre de ces faces ; nous avons vu par contre qu'il ne semblait pas exister de région interdite du côté du bord C_{13} , C_{12} , C_{11} , C_9 , C_{10} . Il est donc raisonnable de penser que l'accès du stéroïde au site enzymatique se fait dans le plan de la molécule selon la flèche du schéma 5 (par le bord opposé C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_{14} , C_{15} , C_{16}).

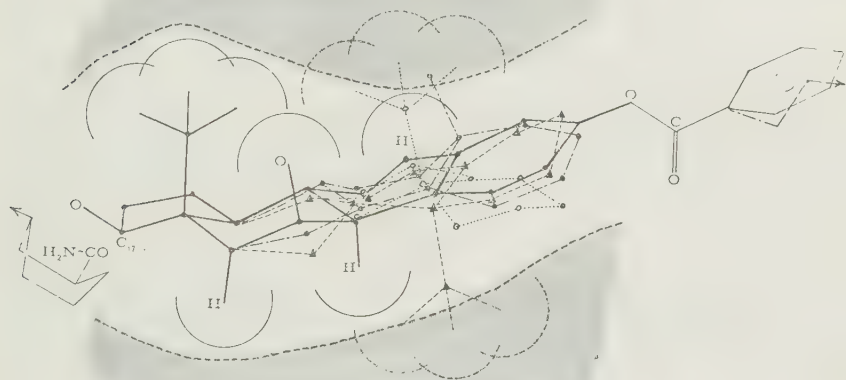


FIG. 6. — Schématisation dans un plan *perpendiculaire* aux substrats du site de la 17- β -hydroxystéroïde : NAD (P) oxydoréductase placentaire.

Hachures : limites des régions interdites sur les faces α et β des substrats.

Arcs de cercle pleins : rayons de Van der Waals des hydrogènes acceptables par le site.

Arcs de cercle pointillés : rayons de Van der Waals des hydrogènes non acceptables par le site.

- — ● : liaison C-C de l'œstra-1,3,5 (10)-triène.
- ▲ — ▲ : liaison C-C de la rétro testostérone.
- ○ : liaison C-C de la testostérone.
- - - - ● : liaison C-C d'un stéroïde de type « Westphalen ».

Il se dégage de cette étude une représentation schématique du site enzymatique qui apparaît comparable à une dépression ou une fente de largeur inégale présentant une zone « large » recevant les cycles C et D (largeur 6 à 7 Å), une zone « étroite » correspondant aux cycles A et B (largeur 3,5 à 4,5 Å) et une zone librement ouverte du côté opposé au site de réduction ; la zone de pincement est schématisée par la zone hachurée de la figure 6 et s'étend en partie au-dessus des cycles B et A sur une longueur d'environ 9 Å et une largeur d'au moins 6 Å ; elle pourrait correspondre à la présence d'un résidu d'acide aminé ayant quelque affinité pour les électrons délocalisés des cycles A ou B ; le noyau indole d'un

résidu de tryptophane satisfierait à ces conditions : cette hypothèse est en accord avec une étude préliminaire du spectre de fluorescence de cet enzyme.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Messieurs les Professeurs G. BRIZIARELLI (I) (Vismara, Terapeutici, Casatenovo, Italie), DE BRUYN (II) (Laboratoire Philips - Duphar Weeps, Pays-Bas), Madame MOUSSERON-CANET (III) (Laboratoire de Chimie Organique ENSC, Montpellier), au Docteur P. POIRIER (IV) (Laboratoires Roussel-Uclaf, Paris) et à Monsieur H. BLOCH (V) (Laboratoire de Chimie Organique, ENSC, Strasbourg) pour nous avoir fourni les stéroïdes ci-après :

- I : 46.
- II : 48.
- III : 5, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25.
- IV : 8, 9, 10, 13, 24, 27, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 44.
- V : 45.

Tous les autres stéroïdes utilisés dans ce travail ont été synthétisés dans le laboratoire par Messieurs J. BASCOUL et B. COCTON avec l'aide technique de Madame C. CHAVIS (Ingénieur Technicien INSERM) et de Mademoiselle N. DOMERGUE (Technicienne CNRS) : 1, 2, 3, 4, 12, 21, 22, 23, 26, 28, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 47, 49.

SUMMARY.

The purpose of this investigation is to determine the geometry of the enzymatic site of this dehydrogenase by means of theoretic concepts developed by PRELOG, already analyzed and proved in the study of 3(or 17)- β -hydroxysteroid oxidoreductase of *Pseudomonas testosteroni*. Thus the tested substrates have been chosen in order to determine exactly the « prohibited region » in the (5 α) gonane nucleus plane on both sides of this plane (faces α and β).

This investigation has been performed on about fifty 17- β -hydroxysteroids as well as on some bi, tri or pentacyclic hydroxylated substrates showing on the level of the oxidisable function a trans hydrindane junction analogous to the one of 17- β -œstradiol.

The following outstanding features have been developed making it possible to ascertain the difference between this enzyme and the bacterial one :

1°) *Non-aromatic* 17- β -hydroxy œstrane steroids are oxidised at much higher speeds than their 19-methyl (17- β -hydroxy androstane steroid) homologs.

2°) The 3 oxo, 17- β -hydrosteroids do not cause inhibition in the presence of excess substrate.

3°) The enzymatic site admits substrates substituted in C₈ by cumbersome groups : benzyl, phthalyl, caproyl.

4°) The accumulation of electrons delocalized on the B cycle level seems to promote substrate adaptation to the enzymatic site.

The shape of the enzymatic site drawn from this investigation may be compared to a depression or an irregular split with an upper concavity as a large area (6-7 Å) receiving the cycles C and D and a narrow area (3,5 to 4,5 Å) corresponding to the cycles A and B, which is freely open on the side opposite to the reduction site, the steroid entering the enzymatic site on the molecule plane through the edge C₃, C₁₅, C₅, C₆, C₇, C₈, C₁₄, C₁₃, C₁₀.

ZUSAMMENFASSUNG.

Diese Arbeit soll die Geometrie des Enzymzentrums dieser Deshydrogenase bestimmen, indem die von PRELOG entwickelten theoretischen Begriffe, die schon in der Untersuchung der 3(oder 17)- β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase von *Pseu-*

domonas testosteroni analysiert und rechtfertigt worden sind, benutzt werden. Zu diesem Zweck sind die versuchten Substrate so gewählt worden, dass sie die « verbotenen Gebiete » in der Ebene des (5 α)-Gonan-Kerns dieseits und jenseits dieser Ebene (Seiten α und β) näher bestimmen konnten.

Diese Untersuchung wurde mit fast fünfzig 17- β -Hydroxysteroiden sowie mit einigen bi-, tri- oder pentazyklischen hydroxylierten Substraten, die auf der Stufe der oxydierbaren Funktion eine mit derjenigen des 17- β - α -Estradiols ähnliche Transhydrindan-Verbindung aufweisen, durchgeführt worden. Es folgt daraus, dass die folgenden bemerkenswerten Elemente deutlich dieses Enzym vom Bakterien-Enzym unterscheiden :

1. Die nicht aromatischen 17- β -Hydroxyöstransteroiden werden mit Geschwindigkeiten, die viel grösser als die der 19-Methyl (17- β -Hydroxyandrostansteroid)-Homologen, oxydiert.

2. Die 3-Oxo,17- β -Hydroxysteroiden ergeben keine Inhibition mit einem Substratüberschuss.

3. Das enzymatische Zentrum erkennt Substrate, die in C₂ durch sperrige Gruppen substituiert werden : Benzyl, Phtalyl, Kaproyl.

4. Die Anhäufung von delokalisierten Elektronen im B-Zyklus scheint die Adaptation des Substrats ans Enzym-Zentrum zu begünstigen.

Der durch diese Untersuchung festgesetzte Abdruck des Enzym-Zentrums kann mit einer Senkung oder einer unregelmässigen Spalte verglichen werden, deren höhere Konkavität eine breite (6 bis 7 Å) Zone, die die C- und D-Zyklen aufnimmt, und eine enge (3,5 bis 4,5 Å) Zone, die den A- und B-Zyklen entspricht, aufweist ; dieselbe ist frei geöffnet auf der dem Reduktionszentrum entgegengesetzten Seite und der Zutritt des Steroids zum Enzymzentrum erfolgt in der Ebene des Moleküls auf der Seite C₆, C₄, C₅, C₈, C₇, C₉, C₁₄, C₁₅, C₁₆.

BIBLIOGRAPHIE.

1. LEVY, H. R., TALALAY, P. et VENNESLAND, B. — Progress in stereochemistry, 1962, 3, 299 (P. B. D. de la Mare, W. Klyne Edit., Londres).
2. JARABAK, J. et TALALAY, P. — *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2147.
3. WARREN, J. C., GONZALEZ, M. C. et SORIA, J. — *Endocrinology*, 1967, 80, 784.
4. TALALAY, P., LEOWUS, F. A. et VENNESLAND, B. — *J. Biol. Chem.*, 1955, 212, 301.
5. FOSSET, M. et CRASTES DE PAULET, A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1967, 49, 1083.
6. FOSSET, M. et CRASTES DE PAULET, A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1969 (sous presse).
7. DESCOMPS, B., NICOLAS, J. C. et CRASTES DE PAULET, A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, 50, 1681.
8. GOMORI, G. — In : Methods in enzymology, 1955, 1, 138, COLOWICH, S. P. et KAPLAN, N. O. Editeurs (Academic Press).
9. LANGER, L. J., ALEXANDER, J. A. et ENGEL, L. L. — *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 2609.
10. EADIE, G. S., BERNHEIM, F. et BERNHEIM, M. L. C. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 181, 449.
11. LANGER, L. J. et ENGEL, L. L. — *J. Biol. Chem.*, 1958, 233, 583.
12. LAIDLER, K. J. — The Chemical Kinetics of Enzyme Action 1958, 115, Clarendon Press, Oxford.
13. ADAMS, J. A., JARABAK, J. et TALALAY, P. — *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 3069.
14. PURDY, R., HALLA, M. et LITTLE, B. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 89, 557.
15. WARREN, J. C. et CRIST, R. D. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, 118, 577.
16. LIARAKOS, C. et MAY, M. — *Endocrinology*, 1969, 84, 1247.



IMPRIMERIE M. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.

